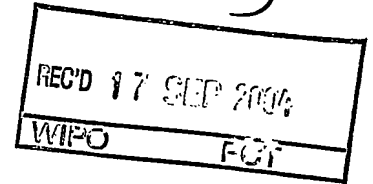


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

E 604 108469

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 36 705.5

Anmeldetag:

06. August 2003

Anmelder/Inhaber:

RiNA Netzwerk RNA-Technologien GmbH,
14195 Berlin/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung eines Lysats zur
zellfreien Proteinbiosynthese

IPC:

C 12 N 1/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 18. August 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Holß

Albrecht, Lücke & Jungblut
Patentanwälte
Gelfertstr 56, 14195 Berlin



DE-Patentanmeldung

Dipl.-Ing. Hans Albrecht
Patentanwalt (1933 - 1979)

Dipl.-Ing. Dierck-Wilm Lücke
Patentanwalt / European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Dipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut
Patentanwalt / European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Anwaltsakte: RNA/DE/0305

Datum: 05.08.2003/*

Anmelder: RiNA Netzwerk RNA-Technologien GmbH
Takustraße 3
14195 Berlin

Titel: Verfahren zur Herstellung eines Lysats zur zellfreien
Proteinbiosynthese

Erfinder: 1) Dr. Micheal GERRITS, Takustrasse 3, D-14195 Berlin
2) Dr. Jan STREY, Takustrasse 3, D-14195 Berlin
3) Dr. Wolfgang STIEGE, Takustrasse 3, D-14195 Berlin

Priorität:

0 05.08.03

Zusammenfassung

Die Erfindung lehrt ein Verfahren zur Herstellung eines Lysates zur zellfreien Proteinbiosynthese mit den folgenden Verfahrensschritten: a) Austausch einer für ein essentielles, jedoch die Ausbeute einer zellfreien Proteinbiosynthese reduzierendes Translationsprodukt codierenden genomischen Sequenz in einem Organismus gegen die unter einem geeigneten regulatorischen Element stehenden fremden DNA, wobei die fremde DNA für das essentielle Translationsprodukt, jedoch zusätzlich enthaltend eine Markersequenz codiert, b) Kultivieren des gemäß a) klonierten Organismus, c) Lyse der Organismen aus der Kultur nach b) und d) Abtrennung des essentiellen Translationsproduktes mittels eines für die Markersequenz selektiven Trennverfahrens sowie das Lysat und dessen Verwendung.

20

25

30

Verfahren zur Herstellung eines Lysates zur zellfreien Proteinbiosynthese

Gebiet der Erfindung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Lysates sowie eine Verwendung des Lysates, wobei das Lysat eine geringe Aktivität essentieller Translationsprodukte aufweist, zur zellfreien Proteinbiosynthese von synthe-

10 tischen Proteinen.

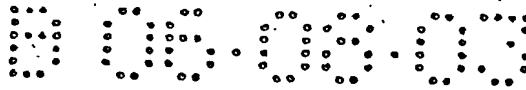
Hintergrund der Erfindung

Proteine werden für biotechnologische und medizinische Anwendungen in hoher Reinheit, insbesondere aber auch in hoher Menge benötigt. Meist ist eine klassische Synthese kaum möglich, jedenfalls in der Regel unwirtschaftlich. Dies betrifft besonders die Herstellung modifizierter Proteine bzw. von Proteinen, die nicht-natürliche Aminosäuren enthalten.

20

Eine Möglichkeit der Herstellung von Proteinen in größerem Maßstab ist die gentechnische Herstellung. Hierzu wird klonierte DNA, welche für das gewünschte Protein codiert, als fremde DNA in Form von Vektoren bzw. Plasmiden in Zellen, insbesondere prokaryontische Zellen, eingeschleust. Diese Zellen werden dann kultiviert, wobei die durch die fremde DNA codierten Proteine exprimiert und gewonnen werden. Zwar lassen sich auf diesem Wege bereits gesteigerte Mengen an Protein gewinnen, die insofern bekannten Maßnahmen, insbesondere die Klonierung, sind jedoch aufwendig. Zudem sind die Zellen meist nur transient transfiziert und nur in Ausnahmefällen stabil immortalisiert. Desweiteren beherbergt die in vivo Proteinbiosynthese mehrere

30



Nachteile: Das zelleigene Expressionssystem unterdrückt die Expression heterologer Genstrukturen oder entsprechende mRNA oder Genprodukte sind instabil oder werden durch intrazelluläre Nukleasen bzw. Proteasen zerstört.

5 Bei toxischen Endprodukten führt die Expression zur Hemmung oder gar zum Absterben des Organismus. Diese Probleme führen dazu, dass eine deutliche Überproduktion des erwünschten Proteins kaum möglich ist.

- 10 Die zellfreie Proteinbiosynthese stellt eine effektive Alternative zur Synthese von Proteinen durch genetisch veränderte Organismen dar, da hier die obengenannten Phänomene vermeidbar sind. Bekannte zellfreie Proteinbiosynthesesysteme sind Lysate von Kaninchenreticulocyten,
- 15 aus Weizenkeimlingen und bakteriellen S30-Extrakten. Methoden zur Herstellung eines Lysates sind dem Fachmann wohl bekannt. Jedoch weiterhin problematisch bei der Verwendung eines Lysates ist, dass im Lysat Komponenten enthalten sein können, welche störend in die Produktion des
- 20 gewünschten Proteins eingreifen und somit die Ausbeute reduzieren. Der negative Effekt solcher Komponenten kann durch deren Inhibierung oder Entfernung aus dem Lysat unterbunden werden. Störende Aktivitäten werden bei der Herstellung von Lysaten allein dadurch entfernt, dass der
- 25 Inhalt der Zelle im Verlauf der Aufarbeitung der für die Proteinbiosynthese wichtigen Komponenten fraktioniert wird. Während dieses Prozesses werden beispielsweise Membran- und Zellwandkomponenten, ein großer Teil der chromosomalen DNA sowie niedermolekulare Komponenten abgetrennt.
- 30 Verbliebene Aktivitäten müssen in weiteren Aufarbeitungsschritten beseitigt oder vorab durch genetische Modifizierung des Organismus verhindert werden.

Aus der Literaturstelle US 6,337,191 ist die Verwendung eines Lysates zur Herstellung von Proteinen mit einem verbesserten Energieregenerierungssystem, in welchem optional störende Enzymaktivitäten durch Inhibierung oder Entfernung der unerwünschten Enzyme zusätzlich eliminiert werden, bekannt. Mögliche Methoden sind das Knockoutverfahren, Antisense- oder weitere bekannte Verfahren zur Entfernung von Proteinen, wie Affinitätschromatographien.

10

Auch sind Lysate aus gentechnisch veränderten Zellstämmen bekannt, welche defizient an bestimmten Aktivitäten sind. Beispielfhaft sei hier der genetisch veränderte E. coli-Stamm EcoPro T7 der Firma Novagen genannt, welcher defizient an den Proteasen lon und ompT ist.

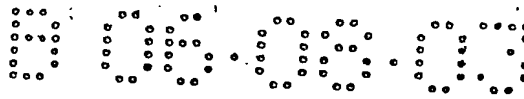
In besonderen Fällen ist das die in vitro Proteinbiosynthese störende Protein für das Wachstum des Organismus unerläßlich. Eine Inaktivierung des Enzyms führt zwangsläufig zum Absterben des Organismus. In solchen Fällen ist das Enzym nachträglich zu inaktivieren oder zu entfernen. Die bereit genannte Literaturstelle US 6,337,191 gibt hierzu diverse Methoden an.

25 Im Wege der zellfreien Proteinbiosynthese lassen sich insbesondere synthetische Proteine, welche unnatürliche Aminosäuren enthalten, herstellen. Hierbei wird das Codon einer Aminosäure durch Mutation in ein Nonsense-Codon entsprechend einem Terminationscodon umgewandelt. Der Einbau
30 unnatürlicher Aminosäuren erfolgt durch zu diesem Terminationscodon komplementäre tRNAs, welche mit den unnatürlichen Aminosäuren synthetisch beladen sind. Das Terminationscodon UAG steht für das Amber-Codon,

entsprechend werden die dem Terminationscodon UAG komplementäre tRNAs als amber-Suppressor-tRNAs bezeichnet. Der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren mit Hilfe von Amber-Suppressor-tRNAs am UAG Stop-Codon steht jedoch in direkter Konkurrenz zum Abbruch der Kettenbildung durch den natürlichen Terminationsfaktor 1 (RF1). Unter Umständen ist die Konkurrenz so stark, dass nur ein sehr geringer Teil der Aminoacyl-tRNA für die Proteinsynthese genutzt wird und ein unerwünscht großer Anteil der Kapazität des Translationssystems für die Synthese terminierter Peptide genutzt wird. Folge dieses Konkurrenzverhaltens ist ein schlechter Einbau der unnatürlichen Aminosäure und somit eine niedrige Ausbeute an modifiziertem Protein, verbunden mit einer hohen Anzahl von unerwünschten Nebenprodukten bestehend aus vorzeitig abgebrochenen oder terminierten Proteinketten.

In der Literaturstelle Shimizu et al.; Nature Biotech 19 (8): 751 - 755, 1991 ist ein Pure-System beschrieben, in welchem eine Suppressor-tRNA effizient funktioniert, wenn RF 1 weggelassen wird.

Aus der Literaturstelle Short et al.; Biochemistry 38: 8808 - 8819, 1999 ist ein Temperatur sensibler Terminationsfaktor 1 aus E. Coli bekannt, welcher durch mildes Erhitzen des Lysates inaktiviert wird. Die Steigerung der Ausbeute mit unnatürlichen Aminosäuren modifizierter Proteine ist signifikant. Ebenso sind weniger Nebenprodukte bei der Herstellung des Proteins DHFR zu verzeichnen. Nachteilig an diesem Verfahren ist die Erwärmung des Lysates, durch welche weitere thermosensitive Faktoren des Proteinbiosyntheseapparates zerstört werden.



Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde ein
5 Verfahren zur Herstellung eines Lysates zur zellfreien
Proteinbiosynthese anzugeben, welches einfach ist, wobei
das erhaltene Lysat erhöhte Ausbeuten an synthetischem
Protein im üblichen zellfreien Proteinbiosynthese-
Verfahren erlaubt.

10

Definitionen

Der Begriff "Lysat" umfaßt alle durch Aufschluß eukaryon-
tischer oder prokaryontischer Zellen hergestellte aktiven
15 Zellextrakte.

Unter "essentiellen Translationsprodukten" werden Genpro-
dukte verstanden, welche für das Überleben und/oder die
Vermehrung einer Zelle zwingend notwendig sind.

20

Unter "synthetischen Proteinen" werden zellfrei herg-
estellte Proteine verstanden.

"Reduzierte Ausbeute" bezeichnet, dass die Ausbeute eines
25 synthetischen Proteins durch zellfreie Proteinbiosynthese
in einem Lysat, welches das essentielle Translationspro-
dukt enthält, 10% bezogen auf Gewichte, vorzugsweise 20 %
bis 80%, besonders bevorzugt über 90%, geringer ist als
die Ausbeute des gleichen synthetischen Proteins in einem
30 Lysat gleicher Art und bei ansonsten gleichen Bedingungen,
aus welchem jedoch das essentielle Translationsprodukt
abgetrennt wurde.

Eine "Markersequenz" stellt eine Struktur dar, welche der Identifizierung von Molekülen u.a. Proteinen dient. Eine solche Struktur kann eine kurze Sequenz von Aminosäuren sein, wobei die Anzahl an Aminosäuren bevorzugt kleiner 10, insbesondere zwischen 4 bis 8 ist. Beispielhaft ist eine solche Struktur ein Tag. Eine Markersequenz kann auch für Enzyme codieren, anhand derer das markierte Molekül identifiziert und auch abgetrennt werden kann.

- 10 Eine "Selektionssequenz" codiert für eine Struktur, der unter bestimmten selektiven Bedingungen nur dem Träger dieser Selektionssequenz ein Überleben erlauben. In der Regel handelt es sich um Resistenzgene gegenüber bestimmten Antibiotika. Weitere Selektionssequenzen können
15 aus dem Stoffwechsel der Nukleinsäuren oder der Aminosäuren stammen.

Der Begriff der "Lyse" bezeichnet die Auflösung von Zellen durch Zerstörung der Zellwand bzw. Zellmembran entweder
20 unter Mitwirkung lytischer Enzyme oder durch mechanische oder chemische Einwirkung.

Grundzüge der Erfindung

25

Zur Lösung des technischen Problems lehrt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Lysates zur zellfreien Proteinbiosynthese mit den folgenden Verfahrensschritten:
a) Austausch einer für ein essentielles, jedoch die Aus-
30 beute einer zellfreien Proteinbiosynthese reduzierendes Translationsprodukt codierenden genomischen Sequenz in einem Organismus gegen eine unter einem geeigneten regulatorischen Element stehende fremde DNA, wobei die fremde

- DNA für das essentielle Translationsprodukt, jedoch zusätzlich enthaltend eine Markersequenz codiert, b) Kultivieren des gemäß a) klonierten Organismus, c) Lyse der Organismen aus der Kultur nach b) und d) Abtrennung des
5. essentiellen Translationsproduktes aus dem in c erhaltenen Lysat mittels eines für die Markersequenz selektiven Trennverfahrens. Das regulatorische Element kann ebenfalls fremd sein, es kann sich aber auch um ein natürlicherweise vorliegendes regulatorisches Element handeln. In ersterem
10. Falle muß auch das regulatorische Element, im gleichen Verfahrensschritt, wie die Einführung der fremden DNA oder in einem hiervon verschiedenen Verfahrensschritt, eingeführt werden.
15. Die Herstellung des erfindungsgemäßen Lysates ist einfach, und das erhaltene Lysat erlaubt erhöhte Ausbeuten an synthetischem Protein in zellfreien Proteinbiosynthese-Verfahren, insbesondere eine hohe Ausbeute an Proteinen mit nicht-natürlichen Aminosäuren.
20. Dies wird dadurch erreicht, dass das essentielle Translationsprodukt mit einer Markersequenz versehen wird, durch welche das essentielle Translationsprodukt über die Affinität der Markersequenz aus dem Lysat entfernt oder
25. seine Aktivität inhibiert wird. Die Modifizierung des essentiellen Translationsproduktes erfolgt im chromosomalen Gen des Proteins, so daß das essentielle Translationsprodukt mit der Markersequenz fusioniert exprimiert wird. Eine Markersequenz codiert für eine Struktur, welche eine
30. hohe Affinität für (meist immobilisierte) Bindungsstellen in Trennsystemen zur Aufreinigung oder zu Inhibitoren aufweist. Dadurch kann die Aktivität des essentiellen Translationsproduktes aus einer Mischung von Proteinen oder einer

Mixtur von beliebigen Molekülen, welche die Markersequenz nicht enthalten, entfernt werden.

Durch den Einbau der Markersequenz in das chromosomale Gen
 5 des essentiellen Translationsproduktes des Organismus wird
 eine stabile Transformation des Organismus erreicht. Unter
 dieser Voraussetzung ist eine Kultivierung des gentech-
 nisch veränderten Organismus ohne Verlust seiner zusätzli-
 chen genetischen Information möglich, und zwar auch ohne
 10 Selektionsdruck.

Ein bevorzugtes Merkmal der vorliegenden Erfindung ist,
 dass die Markersequenz die Proteineigenschaften des essen-
 tiellen Translationsproduktes nicht beeinträchtigt. Ein
 15 aktives essentielles Translationsprodukt ist vorteilhaft
 für eine erfolgreiche Kultivierung des genetisch veränder-
 ten Organismus. Die Bestimmung der Funktionalität des mit
 einer Markersequenz versehenen essentiellen Translation-
 spröduktes erfolgt über ein für die Funktion des essen-
 20 tiellen Translationsproduktes spezifisches Assay. Hierzu
 wird ein DNA-Fragment codierend für das essentielle Trans-
 lationsprodukt und die Markersequenz über eine
 Expressions-PCR translatiert. Die Funktionalität wird an-
 hand der Syntheserate des Produktes, an dessen Synthese
 25 das essentielle Translationsprodukt beteiligt ist, beur-
 teilt. Die Syntheserate in Gegenwart des nativen essen-
 tiellen Translationsproduktes wird mit der Syntheserate in
 Gegenwart des modifizierten essentiellen Translationspro-
 duktes verglichen und darüber die Funktionalität beur-
 30 teilt. Die Funktionalität des essentiellen Translations-
 produktes ist durch die Markersequenz nicht beein-
 trächtigt, wenn die Produktsyntheserate des markierten
 essentiellen Translationsproduktes 10%, bevorzugt 40 bis

60 %, insbesondere über 90% der Syntheserate des nativen essentiellen Translationsproduktes beträgt.

Das Lysat aus einem stabil transformierten erfindungs-
 5 gemäßen Organismus enthält bis zu 100 Gew.-% (bezogen auf die Gesamtmenge an Translationsprodukt) das essentielle Translationsprodukt in Fusion mit der Markersequenz und ist allenfalls nur geringfügig (< 10 Gew.-%, sogar < 1 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge an Translationspro-
 10 dukt) mit dem natürlichen essentiellen Translationsprodukt kontaminiert. Durch die Markersequenz ist das im Lysat unerwünschte essentielle Translationsprodukt leicht und effektiv aus dem Lysat entfernbare. Infolgedessen ist die Proteinbiosynthese synthetischer Proteine, in welche
 15 nicht-natürliche Aminosäuren eingebaut sind, schneller, mit höheren Ausbeuten und einer geringeren Anzahl von Nebenprodukten durchführbar.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist, dass speziell nur
 20 eine unerwünschte Komponente aus dem Lysat entfernt werden kann. Es kann aber auch vorgesehen sein, dass mehrere verschiedene unerwünschte Translationsprodukte mit verschiedenen Markersequenzen, vorteilhafterweise jedoch mit der gleichen versehen sind, so dass mit einer Trennmethode
 25 alle unerwünschten Translationsprodukte entfernt werden können. Insofern kann die Verfahrensstufe a) für verschiedene Translationsprodukte ausgeführt werden, wobei die Markersequenz jeweils gleich oder verschieden sein kann.

30

Ausführungsformen der Erfindung

Die Klonierung des Organismus kann durch in Fachkreisen bekannte Transformationsmethoden wie Mikroinjektion, Elektroporation oder durch chemisch vermittelte Aufnahmen der DNA erfolgen.

5

Die Isolierung des erfolgreich klonierten Organismus erfolgt anhand der Selektionssequenz nach in Fachkreisen bekannten Verfahren.

10 Die Kultivierung des Organismus kann im Batch-, Fed-Batch oder kontinuierlichen Verfahren erfolgen.

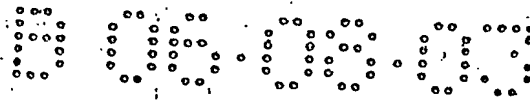
Ebenso kann die Proteinbiosynthese von synthetischen Proteinen enthaltend nicht-natürliche Aminosäuren im Batch-,
15 Fed-Batch oder kontinuierlichen Verfahren erfolgen.

Die Lyse der Zellen erfolgt beispielsweise durch mechanische Einwirkung wie Hochdruckhomogenisation, durch Ultraschall oder durch Aufschluss in Kugelmøhlen.

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das essentielle Translationsprodukt der Terminationsfaktor RF1, welcher das Terminationscodon UAG erkennt. Es versteht sich, dass das essentielle Translationsprodukt auch aus
25 anderen Proteinen, die die Funktion eines Lysates zur zellfreien Proteinbiosynthese herabsetzen, ausgewählt werden kann. Beispielsweise kann das essentielle Translationsprodukt aus einem anderen Terminationsfaktor, aus der Gruppe der Nukleasen, Phosphatasen, Synthetasen etc. aus-
30 gewählt werden.

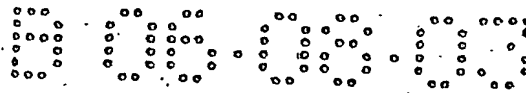
In einer besonderen Ausführungsform ist die Markersequenz ausgewählt aus der Gruppe "StrepTag-II, Polyhistidin,



FLAG, Polyarginin, Polyaspartat, Polygluthamin, Polyphenylalanin, Polycystein, Myc, Gluthadion-S-Transferase, Protein A, Maltose bindendes Protein, Galactose bindendes Protein, Chloramphenicol-Acetyltransferase". Weitere 5 Beispiele sind in den Patentansprüchen angegeben.

Die Markersequenz und das chromosomale Gen des essentiellen Translationsproduktes werden als Fusionsprotein exprimiert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die 10 Markersequenz ein StrepTag-II, eine Peptidstruktur aus 8 Aminosäuren mit Affinität zu StrepTactin. So kann beispielsweise der exprimierte Terminationsfaktor RF1 am c-terminalen Ende das StrepTag-II aufweisen. Die Abtrennung des RF1-StrepTagII-Fusionsproteins erfolgt ent- 15 sprechend an einer mit StrepTactin beladenen Affinitätsmatrix oder anderen SII-bindenden Matrices. Die Abtrennung kann auf der Basis säulenchromatographischer Verfahren, aber auch über Batchverfahren erfolgen. Es versteht sich, dass auch eine andere Markersequenz und ihr 20 entsprechender Affinitätspartner anwendbar ist. Beispielshaft sei hier das PolyHis-Tag genannt. Ein PolyHis-Tag besteht in der Regel aus sechs aufeinanderfolgenden Histindinresten, kann in seiner Länge aber zwischen 4 bis 10 Resten variieren. In einer anderen bevorzugten Aus- 25 führungsform erfolgt die Isolierung der essentiellen Translationsprodukte über entsprechende Antikörper, Antikörperfragmente oder über Aptamere. Unter Umständen bewirkt die Affinität der Bindungspartner auch gleichzeitig eine Inhibition der Aktivität des essentiellen Transla- 30 tionsproduktes.

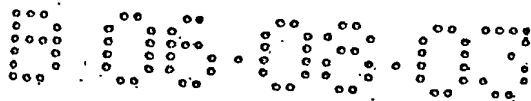
Hinsichtlich der Wahl der Methode zur Proteinabtrennung ist eine Methode auszuwählen, welche die



Translationsaktivität des Lysates nicht negativ beeinflusst, d.h. wichtige Reaktionskomponenten des Translationssystems nicht abgetrennt.

5 Vorzugsweise ist der Organismus zur Herstellung eines Lysates ein Prokaryont. Ergänzend wird auf die Patenanträge verwiesen. Besonders geeignet ist das Translationssystem aus *Escherichia coli*.

- 10 Die Erfindung lehrt desweiteren ein Lysat zur zellfreien Proteinbiosynthese mit einer verminderten Aktivität eines essentiellen Translationsproduktes sowie dessen Verwendung zur Herstellung synthetischer Proteine enthaltend nicht-natürliche oder modifizierte natürliche Aminosäuren. In
- 15 einer bevorzugten Ausführungsform weist das Lysat eine verminderte Aktivität eines an der Termination beteiligten Faktors, bevorzugt RF1, auf. Ein Beispiel für die Herstellung modifizierter synthetischer Proteine ist der Einbau von Biotinyllysine (Biocytin) mittels einer mit der Amino-
- 20 säure aminoacylierten amber-Suppressor-tRNA. Bezüglich der Synthese und Aufreinigung biotinylierter oder anderer StrepTactin-bindender Proteine weist das System einen weiteren Vorteil auf: Da endogene biotinylierte Proteine während der Abtrennung von RF1-II ebenfalls abgetrennt
- 25 werden, wird eine Kontamination von synthetischen Proteinen, die mit Hilfe von Streptavidin oder ähnlichen Matrices aufgereinigt werden, mit biotinylierten Proteinen aus dem Produktionsstamm vermieden. Das Lysat ermöglicht aber auch den effizienteren Einbau anderer funktioneller Gruppen
- 30 in Proteine, besonders bevorzugt den Einbau von Fluorophoren, - oder den einer universell reaktiven Gruppe, über die andere Funktionen selektiv und ortsspezifisch gekoppelt werden können. Eine Verwendungsalternative



ist auch der Einbau von natürlichen Aminosäuren, die beispielsweise isotoopenmarkiert oder selenhaltig vorliegen können.

- 5 Die Beladung der *amber*-Suppressor-tRNA mit der unnatürlichen Aminosäure kann mittels der sogenannten chemischen Aminoacylierung erfolgen oder auch mit Hilfe von Enzymen, beispielsweise Synthetasen oder Ribozyme. Es ist auch möglich, enzymatische und verschiedene chemische Methoden
- 10 miteinander zu kombinieren. Beispielsweise kann die tRNA erst chemisch oder enzymatisch mit Lysin, Cystein oder einer anderen Aminosäure, die eine reaktive Funktion in der Seitenkette enthält, aminoacyliert werden. An die entsprechende Aminoacyl-tRNA wird dann über die reaktive
- 15 Funktion der Aminosäure eine interessante funktionelle Gruppe, beispielsweise ein Fluorophor, mit Hilfe gebräuchlicher chemischer Methoden gekoppelt. So kann beispielsweise die Sulfhydrylgruppe von Cystein über Maleimid modifiziert werden oder eine Aminogruppe über einen NHS-
- 20 Ester. Die Aminoacylbindung der tRNA kann während der Modifikation stabilisiert sein, beispielsweise durch das Vorhandensein einer Schutzgruppe an der alpha-Aminogruppe.

Das System eignet sich für die Beantwortung und Lösung

- 25 wissenschaftlicher Fragestellungen der Proteinforschung. Weiterhin eignet sich das System prinzipiell für ein Ribosomen-Display, da nach der Entfernung eines Terminationfaktors das entsprechende Codon nicht abgelesen werden kann und dadurch der ribosomale Komplex aus mRNA,
- 30 synthetischem Protein und Ribosom eine erhöhte Stabilität aufweist. Das System erlaubt auch eine definierte Einführung von Puromycin oder entsprechender Derivate an der Position des oben genannten Codons. Puromycin konkurriert

normalerweise mit dem ternären Komplex oder Terminationsfaktoren und wird statistisch an das Ende der wachsenden Proteinkette angefügt. Die Generierung eines "ausgehungen-ten" Codons durch die Entfernung eines Terminationsfaktors

5 ermöglicht den definierten Einbau von Puromycin an dieser Position. Auf diese Weise können an synthetische Proteine Funktionen angehängt werden, die an das Puromycin gekoppelt werden, beispielsweise DNA-Oligomere, Zucker oder andere Bausteine.

10

In einer anderen Ausführungsform kann das Lysat auch eine verminderte Aktivität eines anderen essentiellen Translationsproduktes aufweisen, beispielsweise eines aus der Gruppe der Phosphatasen, der Nukleasen, der Synthetasen

15 oder Proteasen. Hierdurch kann die Herstellung solcher synthetischer Proteine verbessert werden, deren Synthese durch die Aktivität anderer essentieller Translationsprodukte als durch die Aktivität der Terminationsfaktoren limitiert wird.

20

Es ist auch möglich, mit Hilfe der dargelegten Methode bestimmte essentielle Translationsprodukte aus dem Lysat zu entfernen, die eine Beantwortung bestimmter wissenschaftlicher Fragestellungen stören, oder deren Entfernung

25 eine Untersuchung bestimmter Fragestellungen erst ermöglicht.

30

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von nicht limitierenden Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1: Konkurrenzverhalten von RF1 und
amber-Suppressor-tRNA

In der Figur 1 ist eine schematische Darstellung des Konkurrenzverhaltens von RF1 und einer amber-Suppressor-tRNA dargestellt. Je nachdem welches der beiden Moleküle 5 mit dem Codon UAG paart, wird das Protein terminiert oder eine Aminosäure eingebaut und die Translation mit der Bildung des Suppressionsproduktes fortgeführt.

10 Beispiel 2: Voruntersuchungen zur Funktionalität von RF1-SII: Expressions-PCR

Da eine Inaktivierung des Terminationsfaktors RF1 lethal für den Organismus wäre, wurde der Einfluß des angefügten 15 StrepTags II auf die Aktivität von RF1 untersucht. Für diese Untersuchung wurde RF1 ausschließlich von Expressions-PCR-Produkten translatiert. Figur 2 zeigt die präparative Expression und Aufreinigung von RF1-SII. R entspricht der in vitro Translationsreaktion, D dem Durch- 20 lauf, W1, W2, W3 den Waschfraktionen und E1, E2, E3 den Elutionsfraktionen.

Beispiel 3: Voruntersuchungen zur Funktionalität von RF1-SII: Amber-Suppressor-Assay

25

Figur 3 zeigt den Funktionstest von RF1-SII im amber-Suppressor-Assay. Die Ziffern 1 in Figur 3A bezeichnet die Durchführung des Assays in einem Ansatz ohne Zugabe von Suppressor-tRNA. Die Ziffern 2 bis 5 sind Ansätze mit 30 Suppressor-tRNA (1 μ M). Ansatz 2 enthält kein RF1-SII. Die Ansätze 3 bis 5 sind mit aufgereinigtem RF1-SII (3: 0,0625 μ M, 4: 0,13 μ M, 5: 0,26 μ M) angereichert. Figur B zeigt die Rate der tRNA-Selektion in Abhängigkeit von der Zugabe

von RF1-SII. Die "Rate der tRNA-Selektion" wird berechnet, indem anhand eines PhosphoImage die molaren Mengen an synthetischem Suppressions- und synthetischem Terminationssprodukt bestimmt werden und der Quotient aus den beiden Werten gebildet wird. Die Erhöhung des RF1-SII-Anteils im Ansatz führt zu einer vermehrten Produktion des Terminationsproduktes. Figur 3B zeigt die Rate der tRNA-Selektion in Abhängigkeit von der Mengen RF1-SII im Ansatz. Die tRNA-Selektionrate sinkt mit der Zugabe von RF1-SII von 3,5 auf unter 1 ab und kann durch Erhöhung des RF1-SII-Anteils weiter reduziert werden. Dies bestätigt, dass RF1-SII prinzipiell aktiv ist.

Beispiel 4: Voruntersuchungen zur Funktionalität von RF1-SII: Aktivitätsvergleich mit nativem RF1

Figur 4 stellt den Vergleich der Funktionalität und Aktivität von getaggtm und nativem RF1 im Amber-Suppressions-Assay dar. RF1-SII zeigt gegenüber RF1 eine vergleichbare Aktivität. Figur 4B zeigt für RF1-SII in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an Matrize gegenüber RF1 eine geringere Syntheserate. Unter Berücksichtigung der Syntheseraten von RF1-SII und nativem RF1 wurden dann die Raten der tRNA-Selektion in Gegenwart beider Proteine bei der Expression des Reporterproteins FABPamb88 aus dem PhosphoImage (Fig. 4A) bestimmt. Die für das Reporterprotein kodierende Matrize (pHMFAAmb88) enthält eine amber-Mutation an Aminosäureposition 88. Die Rate der tRNA-Selektion in Gegenwart von RF1-SII ist nahezu identisch mit der in Gegenwart von nativem RF1 (Diagramm 4C). Beide Proteine weisen somit eine vergleichbare Aktivität auf.

Beispiel 5: Simulation der Entfernung von RF1-SII aus Lysaten

5

Zur Simulation der Entfernung von RF1-SII aus Lysaten wurde RF1-SII präparativ hergestellt und mit ^{14}C -Leucin (100 dpm/pmol) markiert. Im Anschluß daran wurde das synthetisierte, aufgereinigte RF-SII einem S30-Lysat in einer

10

Endkonzentration von $0,1 \mu\text{M}$ (in $1\times$ TLM-Puffer, $215 A_{260}/\text{ml}$) zugegeben. Die Abtrennung des RF1-SII erfolgt über eine StrepTactin-Säule, wobei insgesamt $500 \mu\text{l}$ Lysat (= ca. $110 A_{260}$) auf $200 \mu\text{l}$ Säule in drei Schritten à $166 \mu\text{l}$

15

aufgetragen wurden. Das Waschvolumen betrug je $200 \mu\text{l}$. In Figur 5 ist das Elutionsverhalten von Lysatkomponenten und speziell von RF1-SII mit und ohne Zugabe von NaCl sowie der jeweilige Anteil von RF1-SII im Lysat dargestellt.

20

Figur 5A zeigt das Elutionsverhalten von Lysatkomponenten. Aus Figur 5A ist zu entnehmen, dass die Lysatkomponenten größtenteils nicht oder nur unspezifisch an der Säule gebunden wurden. Unspezifisch gebundene Lysatkomponenten wurden durch Waschen leicht wieder eluiert (Waschfraktionen). Das verwendete Verfahren mindert somit nicht die Aktivität des Lysates durch Abtrennung erwünschter

25

Lysatkomponenten. In Figur 5B ist das Elutionsverhalten von RF1-SII dargestellt und offenbart, dass RF1-SII spezifisch an der StrepTactin-Säule bindet und erst durch die Elutionslösung von der Säule eluiert wird (Elutionsfraktion, Figur 5B). In den Fraktionen des Durchlaufs sowie

30

des Waschen ist RF1 nur geringfügig enthalten. Die Figuren C1 und C2 zeigen den Anteil von RF1-SII im Lysat in Abhängigkeit vom jeweiligen Abtrennungsschritt. Figur C1 enthält die Werte dpm RF1/ml im Verhältnis zu OD_{260}/ml des

Lysates. Der Anteil von RF1-SII (dpm/OD260) im reinen Lysat in Figur 5C1 ist in Figur 5C2 gleich 100% gesetzt, sodass Figur 5C2 den prozentualen Anteil von RF1-SII im Lysat darstellt. Figur 5C2 zeigt, dass RF1-SII nach den 5 Abtrennungsschritten "Durchlauf" und Waschfraktion" in deutlich geringem Anteil im Lysat enthalten ist.

Beispiel 6: genomische Struktur eines genetisch veränderten Organismus

In der Figur 6 ist eine schematische Darstellung des chromosomalen Gens eines erfindungsgemäß ausgetauschten Proteins vor und nach der Klonierung dargestellt. Man erkennt 15 die ursprüngliche genomische Situation (Figur 6B), welche aus dem RF1-Gen, einem Regulationselement und dem Gen für HemK besteht und die gewünschte genetische Situation (Figur 6A), in welcher an das Gen von RF1 die Markersequenz von StrepTag-II angehängt ist. Desweiteren enthält 20 die gewünschte genetische Situation eine Selektionssequenz, hier eine Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin sowie neue regulatorische Elemente. Ein erfindungsgemäßer Organismus ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH gemäß 25 dem Budapester Vertrag hinterlegt unter der Nummer DSM 15756 (E. coli/RF1-SII).

Beispiel 7: Herstellung eines an RF1 defizienten Lysates

Die Kultivierung dreier E. coli /RF1-SII Klone (a,b,d) wurde in Schüttelkulturen vorgenommen. Die Kulturen wurden in der log-Phase geerntet und mit Hilfe von Ultraschall

aufgeschlossen. Das RF1-SII haltige Lysat wurde in zwei Ansätze geteilt und RF1-SII durch unterschiedliche Methoden abgetrennt. Aus Ansatz A (in Figur 5 entsprechend Index A) wurde RF1-SII durch Affinitätschromatographie an einer StrepTactin-Säule (500 μ l Lysat (= ca. 110 A_{260}) auf 200 μ l Säule) abgetrennt. Der Ansatz B (in Figur 7 entsprechend Index B) wurde einer Präinkubation (400 mM NaCl) unterworfen und im Anschluß daran RF1-SII über eine StrepTag-Säule (500 μ l Lysat (= ca. 125 A_{260}) auf 200 μ l Säule) abgetrennt. Hiernach erfolgte Entsalzung über NAP 5. Die Ergebnisse sind der Figur 7 A und B zu entnehmen, welche den Nachweis von RF1-SII mittels SDS-Page und Westernblot im Elutionsvolumen zeigt. Figur 7A zeigt die Coomassieblaufärbung des Geles. Figur 7B zeigt die Detektion von RF1-SII mit Streptavidin-HRP oder Anti-SII (monoklonale Antikörper gegen StrepTag). Als Standard dient in vitro translatiertes und aufgereinigtes RF1-SII. LMW6 ist ein Molekulargewichtsmarker, K_A ein Lysat aus einem gentechnisch unveränderten E. Coli-Stamm, welches der Abtrennungsmethode des Ansatzes A unterworfen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass RF1-SII durch beide Methoden aus dem Lysat erfolgreich abgetrennt wurde.

Beispiel 8: Expression von RF1-SII

Es wurden zwei E. coli-Stämme mit dem unter Beispiel 6 angegebenen synthetischen DNA-Fragment (gewünschte genetische Situation) geklont. Mit Hilfe der Expressions-PCR wurden die Proteine RF1 und HemK aus der chromosomalen DNA (E. Coli K12) amplifiziert, kloniert und sequenziert. Über die PCR wurde auch die StrepTag-Sequenz (SII) an das Gen für RF1 angefügt sowie die neuen Regulationselemente für

die Expression von HemK eingefügt. Beide Proteine wurden zellfrei translatiert, um ihre Exprimierbarkeit sowie im Falle von RF1 auch ihre Funktionalität zu überprüfen. Hierauf begann die Herstellung der Genkassette mit der gewünschten genomischen Situation für den chromosomalen Austausch. Es wurden drei PCR-Fragmente (mit den Genen für RF1-SII, für die Kanamycin-Resistenz sowie für HemK) hergestellt und miteinander ligiert. Die Ligation erfolgt unter Verwendung asymmetrischer Restriktionsschnittstellen in einer Eintopfreaktion, d.h. die drei Fragmente wurden in einem Schritt miteinander ligiert. Das entstehende DNA-Fragment mit der gewünschten genomischen Situation wurde geluliert, in einen Vektor kloniert, sequenziert und mit Hilfe der PCR amplifiziert. Hierauf erfolgte die Transformation des PCR-generierten linearen Fragments in E. coli D10 mit Hilfe der Elektroporation. Die Kanamycin-Resistenz wurde für die Selektion auf Klone mit der gewünschten genomischen Situation verwendet. Hierzu wurden die Zellen auf Kanamycin-Platten ausgestrichen. Die vier positiven Klone wurden einer Gegenselektion in ampicillinhaltigem Medium unterzogen, um ausschließen zu können, dass das für die Amplifikation des Genfragmentes verwendete Plasmid, das eine Ampicillin-Resistenz trägt, transformiert wurde. Weiterhin wurde mit Hilfe der Kolonie-PCR das Vorhandensein des gewünschten Genfragmentes innerhalb des E. Coli-Chromosoms überprüft. Hierzu wurde ein Primer, der innerhalb der Kassette hybridisiert, mit einem Primer kombiniert, der im E. coli-Chromosom außerhalb der transformierten Kassette hybridisiert. Alle vier positiven Klone wiesen die gewünschte genomische Situation auf. Figur 8 zeigt die in vivo Expression von RF1-SII im Westernblot. Die Abtrennung von RF1-SII erfolgte über eine StrepTactin-Säule. Der Nachweis des Proteins wurde mit

Anti-SII (monoklonaler Antikörper gegen StrepTag) durchgeführt. Die Figur 8 zeigt eine deutliche Expression von RF1-SII in den beiden Klonen a und b. Die Negativkontrolle "0" aus einem genetisch unverändertem Stamm zeigt keine Expression von RF1-SII. Die Probe "K" ist in vitro translatiertes RF1-SII und dient als Marker und Positivkontrolle.

10 Beispiel 9: Einfluß der RF1-Abtrennung auf die Effizienz der Suppression im regenerierbaren System.

Die Figur 9 stellt das Ergebnis der in vitro Proteinbiosynthese mit einem erfindungsgemäßen Lysat und einem RF1 haltigen Lysat dar. Figur 9A zeigt das PhoshoImage eines SDS-Gels, welches die jeweiligen Anteile des Terminationssproduktes und des Suppressionsproduktes vor und nach der Abtrennung von RF1 in Abhängigkeit von der Menge an Suppressor-tRNA zeigt. In diesem Fall wurde eine enzymatisch aminoacylierbare tRNA verwendet. Bei einem Suppressor-tRNA-Anteil von $1,2 \mu\text{M}$ im RF1-defizienten Lysat sind nur noch geringe Mengen des Terminationsproduktes detektierbar. Durch Abtrennung von RF1 wird die Translation des Suppressionsproduktes erhöht (Figur 9B) und gleichzeitig das Verhältnis Suppressionsprodukt/Terminationsprodukt auf die Seite des Suppressionsproduktes verschoben (Figur 9C). Zudem wird die Syntheserate des Suppressionsproduktes durch höhere Zugabemengen der Suppressor-tRNA gesteigert. Im Ergebnis wird durch Abtrennung von RF1 aus einem Lysat die Syntheserate eines Suppressionsproduktes deutlich erhöht und somit die Ausbeute gesteigert.

Beispiel 10: Einbau einer nicht-natürlichen Aminosäure

Die Figur 10 zeigt beispielhaft den gesteigerten Einbau von Biotinyllysin in Abwesenheit von RF1 in FABP (Figur 10A, PhosphoImage). Es wurde eine amber-Suppressor tRNA verwendet, die über chemische Methoden mit Biotinyllysin (Biocytin) beladen wurde. Die Markierung der translatierten Proteine mit ^{14}C -Leucin bestätigt die höhere Syntheserate an biotinyliertem FABP in einem RF1-defizienten Lysat (Figur 10B und C).

Beispiel 11: Einbau von Biocytin mit Hilfe einer mit chemischen Methoden beladenen *amber*-Suppressor-tRNA - Nachweis biotinylierter Proteine im Westernblot

Fig. 11A zeigt den Westernblot, 11B die Quantifizierung des Westernblots über die Detektion von Chemilumineszenz. Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen StrepTag II verwendet, der mit HRP gekoppelt war. Der Westernblot zeigt eindeutig die stark erhöhte Synthese an synthetischem biotinyliertem Protein im Lysat nach RF1-Abtrennung. Weiterhin zeigt der Blot, daß durch die verwendete Methode zur Herstellung des RF1-defizienten Lysat auch endogene biotinylierte Proteine entfernt werden: Das in Lysaten aus *E. coli* relativ hochkonzentrierte endogene Protein BCCP wird nach RF1-Abtrennung kaum noch detektiert. Die Quantifizierung des Westernblots zeigt noch einmal die stark erhöhte Synthese an synthetischem modifiziertem Protein im RF1-defizienten Lysat und

05.08.03

23

bestätigt die über Radioaktivität durchgeführte Quantifizierung aus Beispiel 10.

5 Beispiel 12: Einbau von Biocytin in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

Mit längerer Reaktionszeit wird, wie Figur 12 zeigt, vermehrt Biotinyllysin (Biocytin) eingebaut. Infolgedessen erhöht sich der Anteil an Suppressionsprodukt an der Gesamtproduktmenge. Durch längere Reaktionszeiten wird die Ausbeute des biotinylierten Suppressionsproduktes gesteigert.

15

20

25

30

Patentansprüche:

1) Verfahren zur Herstellung eines Lysates zur zellfreien
Proteinbiosynthese mit den folgenden
Verfahrensschritten:

a) Austausch einer für ein essentielles, jedoch die
Ausbeute einer zellfreien Proteinbiosynthese reduzierendes
Translationsprodukt codierenden genomischen Sequenz in einem Organismus gegen eine
unter einem geeigneten regulatorischen Element stehende fremde DNA, wobei die fremde DNA für das essentielle
Translationsprodukt, jedoch zusätzlich
enthaltend eine Markersequenz codiert,

b) Kultivieren des gemäß a) transformierten Organismus,

c) Lyse der Organismen aus der Kultur nach b) und

d) Abtrennung des essentiellen Translationsproduktes aus dem in c) erhaltenen Lysat mittels eines für die Markersequenz selektiven Trennverfahrens.

2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das essentielle Translationsprodukt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "RF1, RF2, RF3, eRF".

3) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Markersequenz ausgewählt ist

aus der Gruppe "StrepTag-II, Polyhistidin, FLAG, Polyarginin, Polyaspartat, Polyglutamin, Polyphenylalanin, Polycystein, Myc, Gluthadion-S-Transferase, Protein A, Maltose bindendes Protein, Galactose bindendes Protein, Chloramphenicol-Acetyltransferase, Protein G, Calmodulin, Calmodulin-bindendes Peptid, HAT (= natural histidine affinity tag), SBP (= Streptavidin-bindendes Peptid), Chitin-bindende Domäne, Thioredoxin, β -Galaktosidase, S-Peptid (Reste 1-20 der RNase A), Avidin, Streptavidin, StrepTag-I, Dihydrofolat-Reduktase, lac-Repressor, Cyclomaltodextrin-Glucanotransferase, Cellulose-bindende Domäne, Btag, NanoTag".

- 15 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Markersequenz und das chromosomale Gen als Fusionsprotein exprimiert werden und wobei die translatierte Markersequenz die Aktivität des essentiellen Translationsproduktes im Organismus nicht beeinträchtigt.
- 20 5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Trennverfahren eine Affinitätschromatographie oder ein Antikörper-Assay ist.
- 25 6) Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus ein Prokaryont oder ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Enterobacteriales (z.B. *Escherichia spec.*, *E.coli*), Lactobacillales (z.B. *Lactococcus spec.*, *Streptococcus spec.*), Actinomycetales (z.B. *Streptomyces spec.*, *Corynebacterium*
- 30

spec.), *Pseudomonas spec.*, *Caulobacter spec.*, *Clostridium spec.*, *Bacillus spec.*, *Thermotoga spec.*, *Micrococcus spec.*, *Thermus spec.*"

5

7) Lysat zur zellfreien Proteinbiosynthese erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Lysat eine verminderte Aktivität eines essentiellen Translationsproduktes aufweist.

10

8) Lysat zur zellfreien Proteinbiosynthese nach Anspruch 7, wobei das Lysat eine verminderte Aktivität eines oder mehrerer der essentiellen Translationsprodukte ausgewählt aus der Gruppe "RF1, RF2, RF3, eRF" aufweist.

15

9) Verwendung eines Lysates nach Anspruch 7 oder 8 zur zellfreien Proteinbiosynthese.

20

10) Verwendung nach Anspruch 9, wobei mittels amber-Suppressor-tRNAs natürliche und/oder nicht-natürliche Aminosäuren, bevorzugt Biotinyllysine, fluoreszierende Aminosäuren und/oder Phenylalanin, eingebaut werden.

25

11) Isolierter Mikroorganismus oder isolierte Zelle, wobei eine für ein essentielles, jedoch die Ausbeute einer zellfreien Proteinbiosynthese reduzierendes Translationsprodukt codierende genomische Sequenz gegen eine unter einem geeigneten regulatorischen Element stehende

30

8 05.08.03

27

3

fremde DNA ausgetauscht ist, wobei die fremde DNA für das essentielle Translationsprodukt, jedoch zusätzlich enthaltend eine Markersequenz codiert.

5

12) Mikroorganismus, wie hinterlegt unter DSM 15756.

10

15

20

25

30

8 08.08.03

①

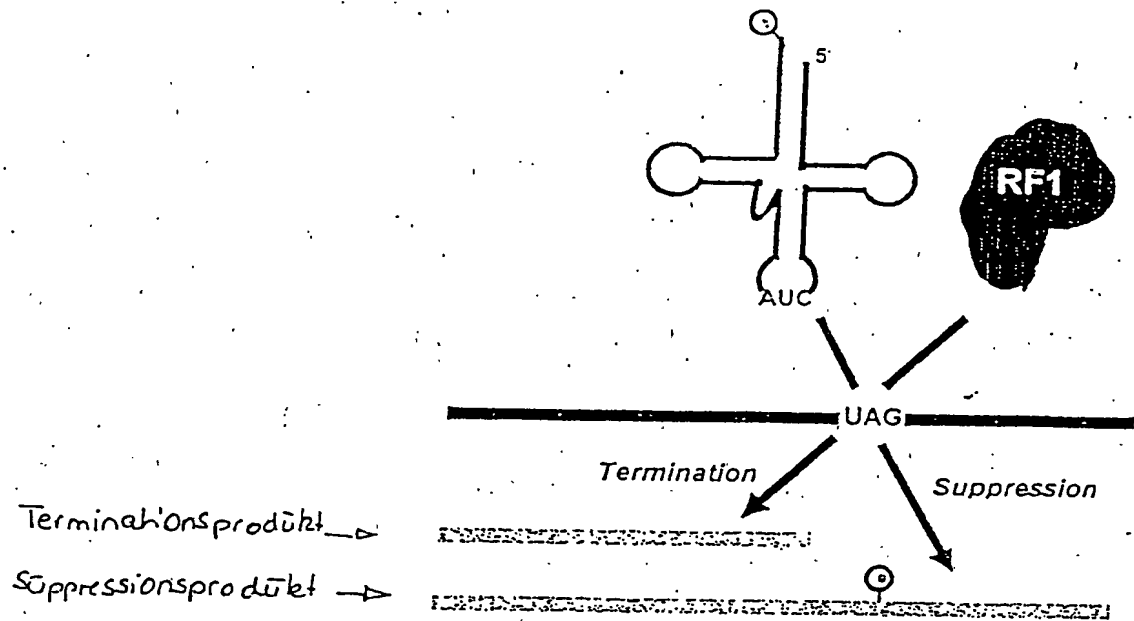


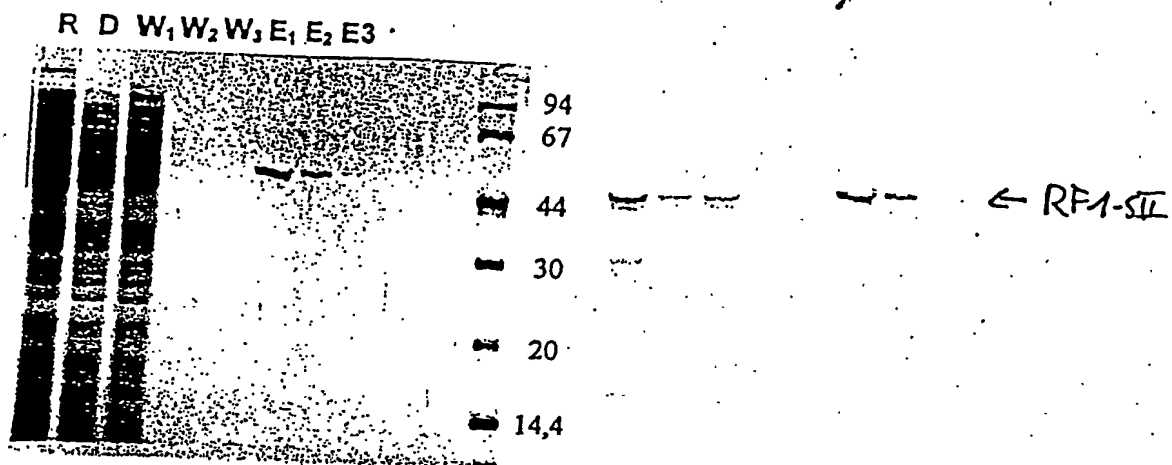
Fig. 1

1008.08.03

~~Fig 8~~

Coomassie-Fabry

PhosphorImage



A (Phosphatase)

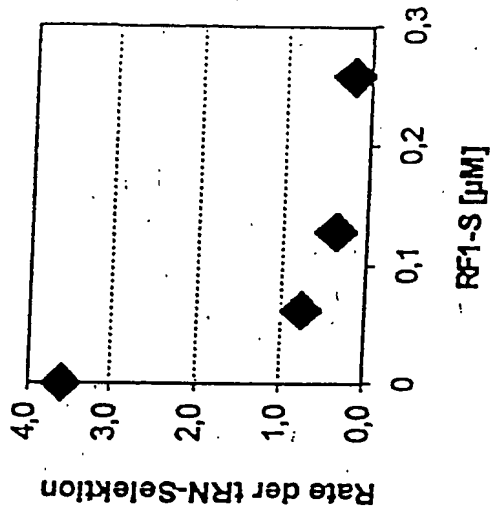
1 2 3 4 5

← RF1-SII

← Sup ("full lenght" FABP)

← Term

B



~~FIG. 7~~

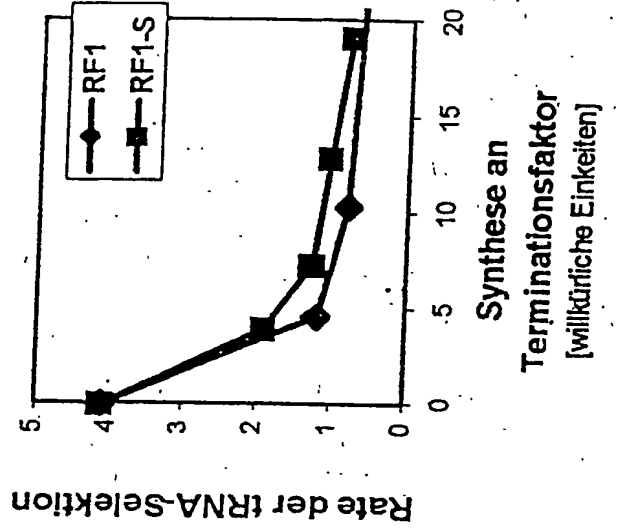
W

0.05 0.1 0.2 0.3

~~8511~~

8FN-SII

evminut: as product



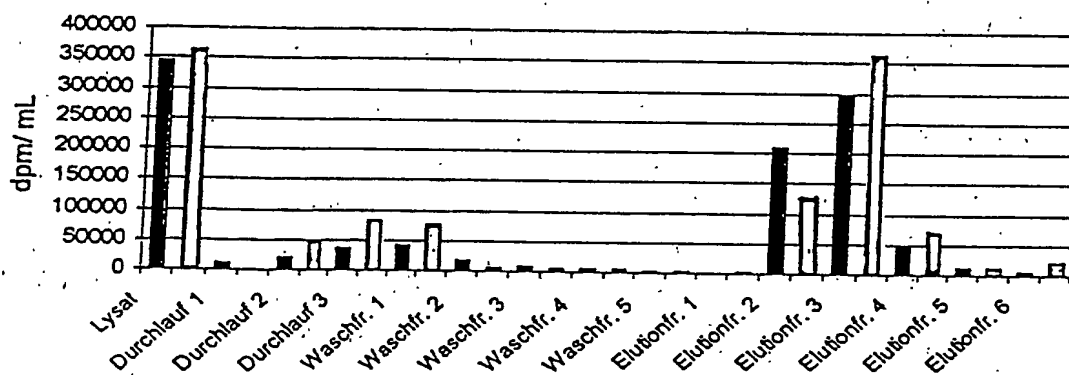
(4)

3

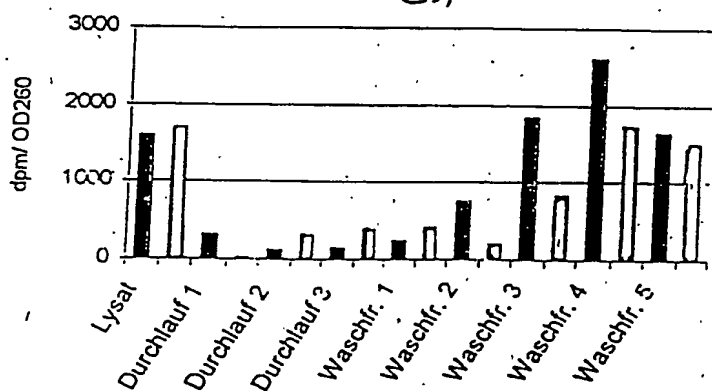
U

Sample	Black Bar (OD260/mL)	White Bar (OD260/mL)
Lysat	~210	~200
Durchlauf 1	~210	~210
Durchlauf 2	~35	~35
Durchlauf 3	~185	~135
Waschr. 1	~225	~200
Waschr. 2	~170	~175
Waschr. 3	~15	~25
Waschr. 4	~2	~2
Waschr. 5	~1	~1

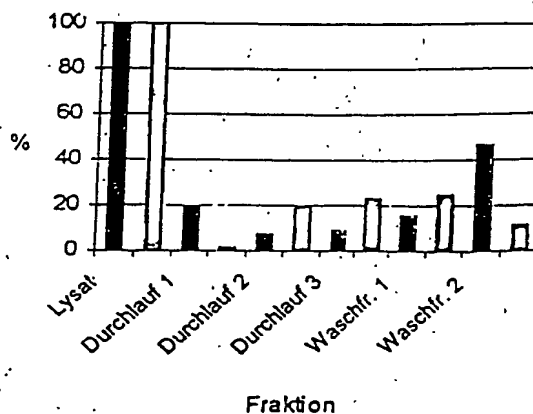
A



R



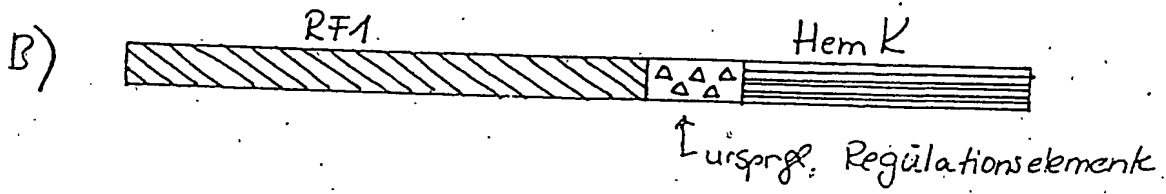
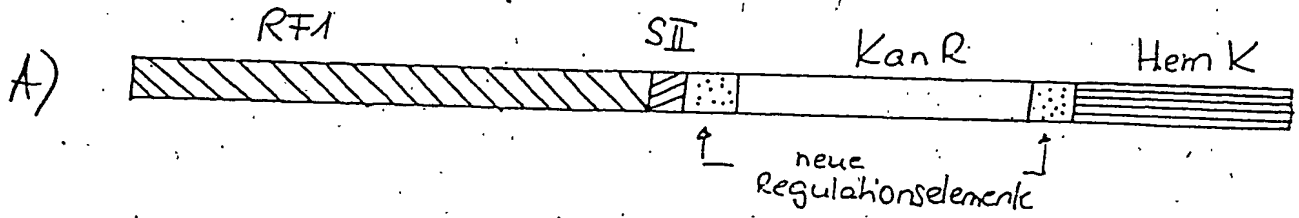
CA



C2

06.03.03

~~Fig 2~~

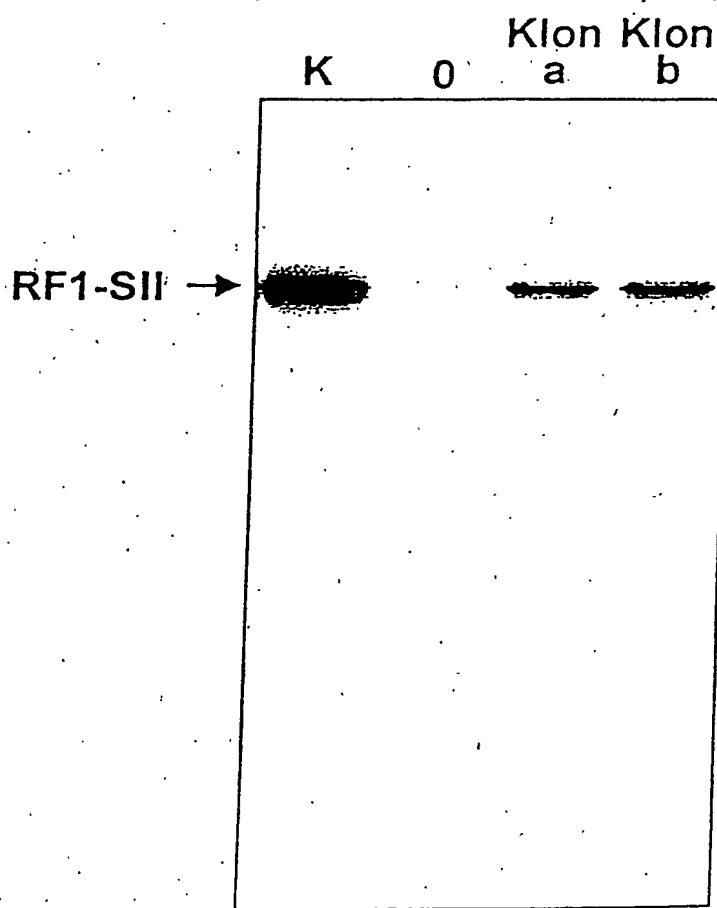


8

08.08.03

C

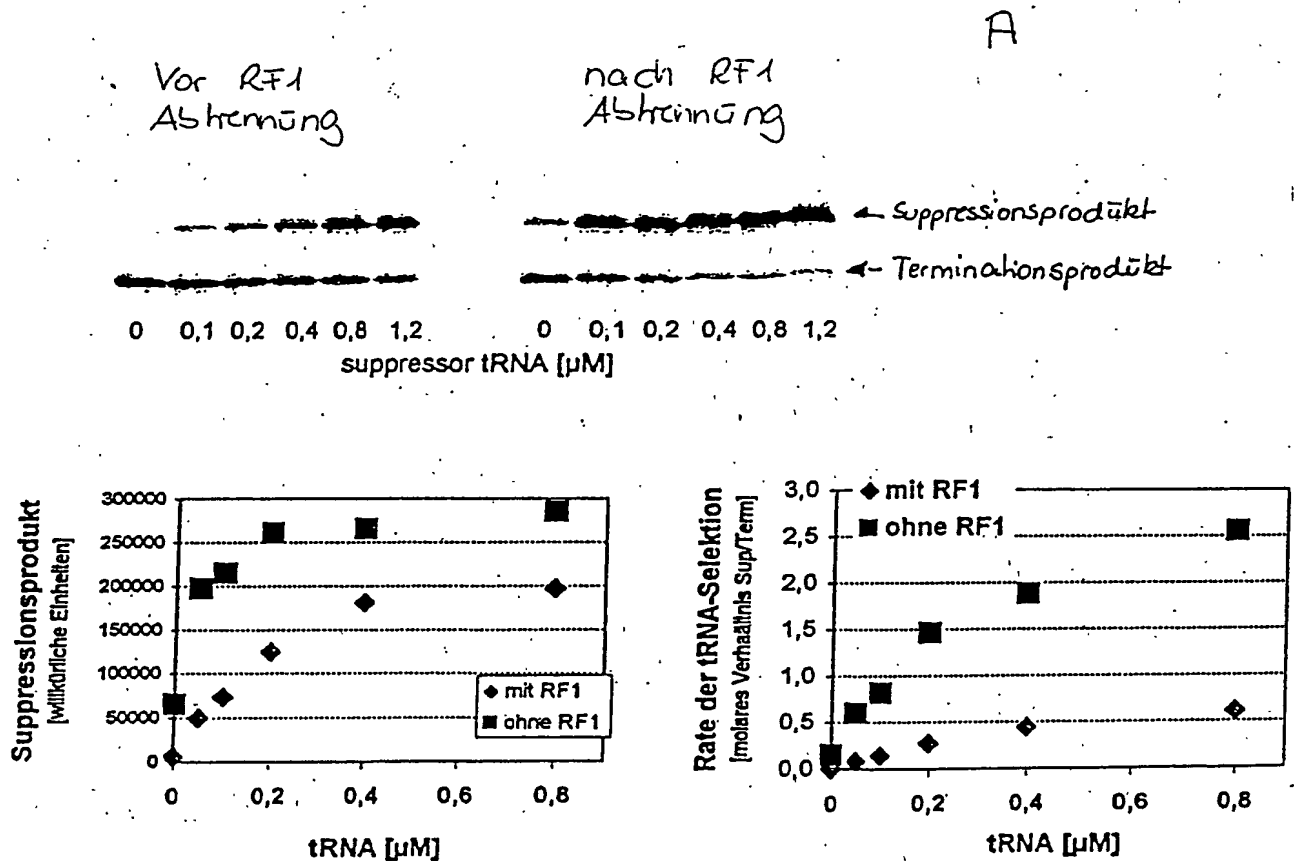
~~7.3~~



01.03.03

4

Fig. 9



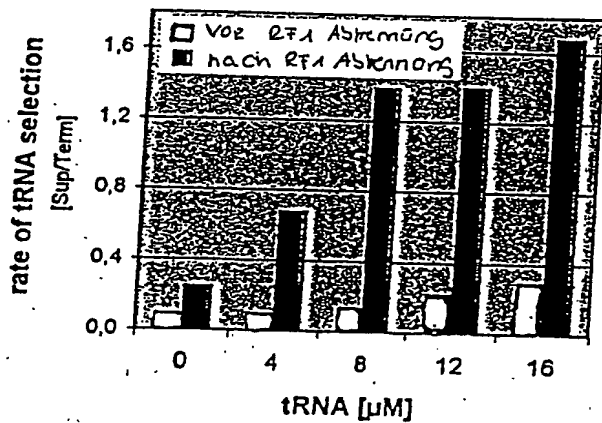
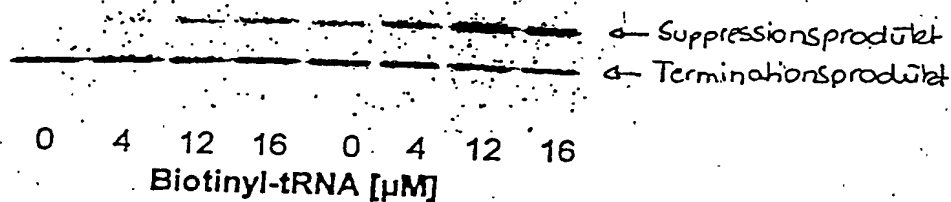
(10) 00.00.00

Fig. 10.

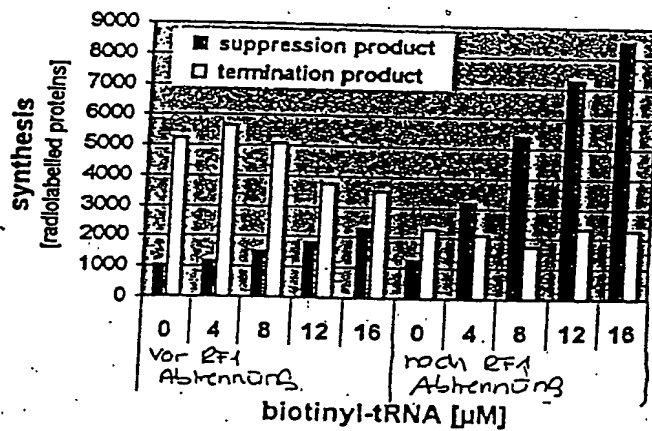
Vor RF1
Abkennung

nach RF1
Abkennung

A



B



C

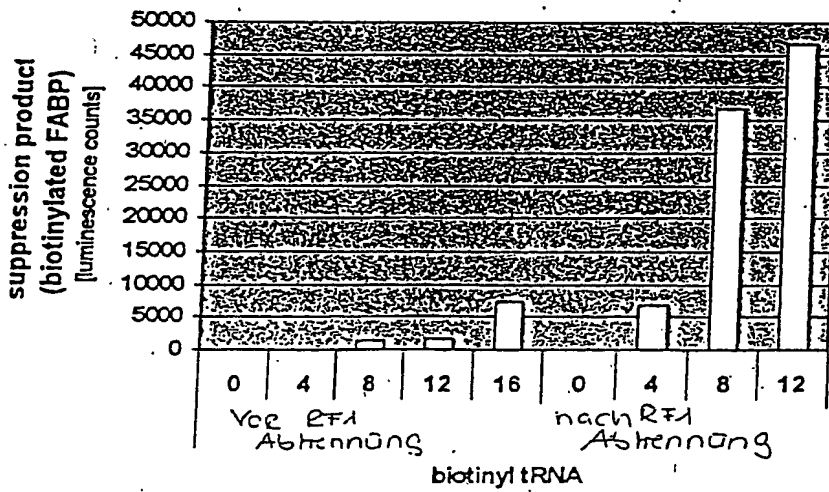
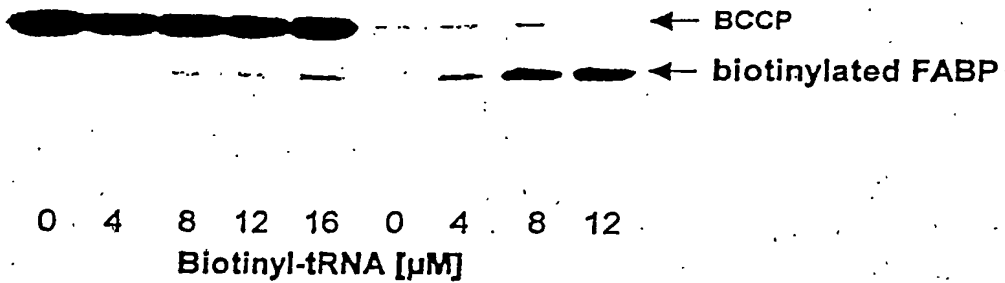
11.09.03

Fig. 11

Vor RF1
Abtrennung

nach RF1
Abtrennung

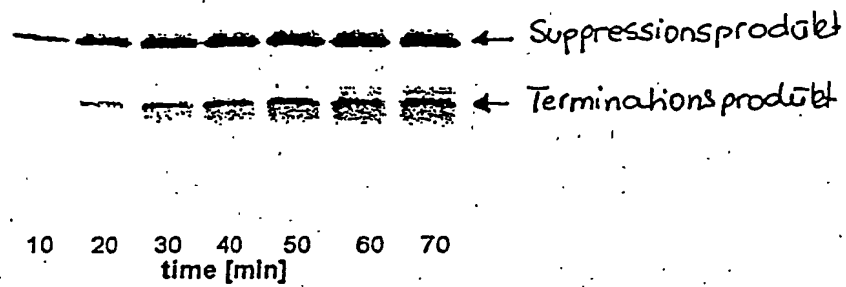
A

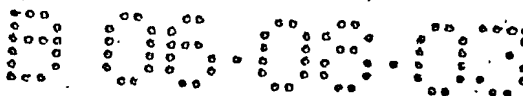


B

12 00 00

Fig. 12





BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH



INTERNATIONALES FORMBLATT

RiNA GmbH

Takustraße 3

14195 Berlin

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS

Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:

RF1-SII

Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE
zugeteilte EINGANGSNUMMER:

DSM 15756

II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG

Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde

☒ eine wissenschaftliche Beschreibung

☒ eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung

eingereicht.
(Zutreffendes ankreuzen).

III. EINGANG UND ANNAHME

Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2003-07-15 (Datum der Erst-
hinterlegung) eingegangen ist.

IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG

Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst-
hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am
eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).

V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE

Name. DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

Anschrift. Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig

Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle
befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:

Datum. 2003-07-16

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen, GmbH




INTERNATIONAL FORM

RiNA GmbH

Takustraße 3

14195 Berlin

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: RF1-SII	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 15756
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: (X) a scientific description (X) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2003-07-15 (date of the original deposit)	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s)  Date: 2003-07-16

Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.



BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONALES FORMBLATT

RiNA GmbH

Takustraße 3

14195 Berlin

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: RiNA GmbH Takustraße 3 Anschrift: 14195 Berlin		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 15756 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 2003-07-15	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2003-07-15 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) lebensfähig () nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST*			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: Datum: 2003-07-16	

Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
Zutreffendes ankreuzen.
Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt wurden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.


INTERNATIONAL FORM

RiNA GmbH

Takustraße 3

14195 Berlin

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: RiNA GmbH Takustraße 3 Address: 14195 Berlin		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 15756 Date of the deposit or the transfer: 2003-07-15	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on On that date, the said microorganism was		2003-07-15 <input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2003-07-16	

Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date, (date of the new deposit or date of the transfer).
 In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
 Mark with a cross the applicable box.
 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.